



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 63 179.7

Anmeldetag: 18. Dezember 2000

Anmelder/Inhaber: Bayer Aktiengesellschaft,
Leverkusen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur spezifischen Detektion von
Tumorzellen und ihren Vorstufen in
Gebärmutterhalsabstrichen durch simultane Messung
von mindestens zwei verschiedenen molekularen
Markern

IPC: C 12 Q, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brand

Verfahren zur spezifischen Detektion von Tumorzellen und ihren Vorstufen in Gebärmutterhalsabstrichen durch simultane Messung von mindestens zwei verschiedenen molekularen Markern

5

Stand der Technik

10 Nach wie vor zählen Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Es besteht ein klinischer Bedarf an der Früherkennung und spezifischen Detektion von Krebs und Krebsvorstufen, um die Entwicklung zum Tumor durch frühzeitige therapeutische Intervention zu verhindern. Aus diesem Grunde werden bereits seit den fünfziger Jahren Vorsorgeprogramme für verschiedene Karzinome (besonders Cervix, Brust und Darm) angeboten, welche in zahlreichen Ländern zu sinkenden Mortalitätsraten geführt haben.

15

Die Vorsorgeuntersuchung beim Gebärmutterhalskrebs der Frau basiert im Wesentlichen auf der morphologisch-zytologischen Untersuchung von Zellabstrichen des Gebärmutterhalses, dem sogenannten PAP Test. Dieser Test weist allerdings eine limitierte Sensitivität (bis zu 40 % falsch negative Diagnosen, Duggan *et al.*, 1998, Eur J Gynaecol Oncol; 19:209-214; Bishop *et al.*, 1996, Buss Pan Am Health Organ, 30,378-86) auf. Des weiteren werden bis zu 10 % der Abstriche als ASCUS klassifiziert (atypical squamous cells of undetermined significance), d.h. eine klare Einordnung in normal, niedrig- oder hochgradige Läsion bzw. Tumor ist nicht möglich. Erfahrungsgemäß befinden sich in dieser ASCUS Population aber bis zu 10 % wahre Läsionen, die somit auch übersehen werden (Manos *et al.*, 1999, JAMA 281, 1605-1610). Bei der Entdeckung abnormaler Zellen werden zusätzliche diagnostische Verfahren wie Kolposkopie oder eine Biopsieentnahme durchgeführt, anhand derer eine verbesserte Diagnose möglich ist und eine Therapieentscheidung, wie z.B. chirurgische Entnahme der pathologischen Region oder Lasertherapie, getroffen werden kann.

20

25

30

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Gene identifiziert, die aufgrund von Mutationen zu einer veränderten Expression ihrer Proteine führen und somit eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Potentiell können die korrespondierenden Proteine als diagnostische Marker sowohl im Serum als auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Die Proteine sind an physiologischen Regulationsprozessen in der Zelle, wie z.B. der Wachstumskontrolle (Proliferationsgene, z.B. Ki67, mcm-5; Onkogene und Tumorsuppressorgene, z.B. p16, EGF-Rezeptor, her2/neu, mdm-2), Apoptose (natürlicher Zelltod, z.B. p53, bcl-2), Reparatur von DNA (msh-1) und Zelladhäsion (E-Cadherin, β -catenin, APC) beteiligt. Zum Nachweis der Marker eignen sich z.B. immunhisto- und immunocytochemische Detektionsmethoden mit spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine (van Noorden, 1986, Immunocytochemistry, Modern Methods and Applications, 2nd edition, Wright, Bristol, 26-53).

Bei bestimmten Krebsarten ist darüber hinaus das Auftreten von Viren signifikant mit der Krebsentstehung assoziiert. Virale DNA wird durch Hybridisierungsverfahren nachgewiesen und dient ebenfalls als diagnostischer Marker, z.B. beim Nachweis humaner Papillomviren in Gebärmutterhalsabstrichen (Detektonskits erhältlich von mehreren Anbietern, z.B. Digene, DAKO, BioGenex, ENZO).

Es ist vielfach gezeigt, dass ein einzelner Marker keine ausreichende Spezifität hinsichtlich der Erkennung von krankhaft veränderten Zellen erreicht, da er zum Teil auch in gesunden Zellen vorhanden ist. Dies basiert auf der Tatsache, dass Marker Proteine sind, die an physiologischen Regulationsprozessen auch in gesunden Zellen beteiligt sind. So ist z.B. HPV in nahezu allen Tumoren des Cervix, jedoch auch in vielen normalen Cervixepithelien nachzuweisen, d.h. ein Test zum Nachweis von HPV weist eine hohe Sensitivität jedoch nur eine geringe Spezifität auf (z.B. Cuzick, 2000, JAMA, 283, 108-109). Williams *et al.* (1998, PNAS, 95, 14932-14937) beschreiben den DNA Replikationsmarker mcm-5, welcher 28 getestete Läsionen/Tumore des Cervix (n=58) detektiert, aber 2 von 28 Normalabstrichen

falsch positiv anfärbt. Sano *et al.* (Pathology Intl., 1998, 48, 580-585) beschreiben, dass der Marker p16 unspezifisch 3 von 15 normalen Cervixbiopsien anfärbt.

5 In der Cytologie/Pathologie ist es zunehmend von Interesse mehrere Marker in einer biologischen Probe nachzuweisen. Zum einen steht damit mehr Information zur Verfügung, zum anderen können unspezifische Färbungen einzelner Marker als solche eher erkannt werden. Traditionell werden zu diesem Zweck serielle Schnitte einer vorhandenen Biopsie bzw. mehrfache Präparationen einer Körperprobe (z.B. Gebärmutterhalsabstrich in Fixierflüssigkeit) hergestellt und mit jeweils einem bestimmten
10 Marker gefärbt. Dieses Verfahren hat mehrere Nachteile: hoher Materialverbrauch der meist limitierten Patientenprobe und von Färbereagenzien, hoher Zeitaufwand und Kosten sowie keine Möglichkeit der eindeutigen Co-Lokalisierung von zwei oder mehreren Markern in einer Zelle. Der simultane Nachweis von zwei oder mehreren verschiedenen biologischen Markern auf einer biologischen Probe ist bereits in
15 der Literatur beschrieben (DAKO, Practical Guide for Immunoenzymatic Double Staining Methods; Gomez *et al.*, Eur. J. Histochem., 1997, 41, 255-259), wird jedoch in der Routinediagnostik bisher nicht angewendet. Terhavauta *et al.* (Cytopathology, 1994, 5, 282-293) verwenden eine Doppelfärbung von p53 und Ki67 auf Biopsien von Cervix-Läsionen und können beide Marker in Basal- und Parabasalzellen von
20 HPV positiven und negativen Läsionen z.T. in einer Zelle nachweisen. Die beschriebene Doppelfärbung wurde auf Cervix-Biopsien durchgeführt und ist nicht übertragbar auf Gebärmutterhalsabstriche. Ebenso ist die Zellzusammensetzung eines Abstrichs, der kaum Basal- und Parabasalzellen aufweist, unterschiedlich zu einer Biopsie. Nach unseren Erkenntnissen ist mit der beschriebenen Markerkombination
25 auf Cervixabstrichen kein diagnostisch auswertbares Ergebnis zu erzielen. Darüber hinaus benutzen die Autoren die gewonnene Information der Doppelfärbung nicht, um durch Kombination der Ergebnisse eine verbesserte Aussage über das Auftreten von Tumorzellen in dieser Probe treffen.

30 Rao *et al.* (1998, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Evolution, 7, 1027-1033) beschreiben eine Mehrfachfärbung von verschiedenen tumorassoziierten Markern

(DNA-Gehalt, G-Aktin und p53) auf Nadelpunktionsmaterial (FNA, fine needle aspi-
rates) der Brust. Sie interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, dass durch die Ver-
wendung mehrerer Marker eine höhere klinische Spezifität erreicht wird, als die
Betrachtung der einzelnen Marker und somit bei der Früherkennung von Brustkrebs
5 eine wichtige Rolle spielen können. Die von den Autoren angeführte Mehrfach-
färbung ist auf Nadelpunktionsmaterial der Brust beschränkt. Es fehlt der Ansatz zur
Nutzung der Färbefinformation im Hinblick auf eine automatisierte Detektion von
Tumorbereichen. Darüber hinaus ist die beschriebene Färbemethodik nicht auf
andere biologische Materialien (i.e. Biopsien, Gebärmutterhalsabstriche) auf Grund
10 der unterschiedlichen Stoffeigenschaften zu übertragen.

Automatisierung:

Eine weitere Verbesserung der momentanen klinischen Tumordiagnostik besteht
15 sowohl in der Automatisierung der Probenpräparation und -färbung, als auch in der
automatisierten Bildanalyse mit Diagnosestellung. Dies führt neben einer zeitlichen
und personellen Ersparnis auch zu einer objektiveren und damit einheitlicheren Diag-
nose. Die Anfärbung von biologischen Markern in Tumorzellen oder deren Vorläu-
fern durch Fluoreszenz oder chromogene Farbstoffe ermöglicht eine Quantifizierung
20 und somit automatisierte Auslesung der Signale. Es gibt bereits Systeme, die eine
automatisierte Durchführung von Färbeprotokollen erlauben, allerdings ohne auto-
matisierte Diagnose durch Bildanalyse (LeNeel *et al*, 1998, Clin Chim Acta, 278,
185-192). Am weitesten fortgeschritten ist die automatisierte Detektion von
Tumorzellen und deren Vorläufern mit Hilfe morphologischer Bildinformationen bei
25 Cervix-Abstrichen (Sawaya *et al*, 1999, Clinical Obstetrics and Gynecology, 42, 922-
938; Stoler, 2000, Mod. Pathol., 13, 275-284).

Boon *et al.* (1995, Diagn. Cytopathol., 13, 423-428) nutzen neben der automatisier-
ten morphologischen Detektion von abnormalen Zellen in Gebärmutterhalsabstrichen
30 mit dem PAPNET System zusätzlich die immunhistochemische Anfärbung von pro-
liferierenden Zellen mit Ki67-Antikörpern. Der Gebrauch dieses einen molekularen

Markers ermöglicht jedoch keine eindeutige Unterscheidung zwischen gutartigen proliferierenden und kanzerogenen Zellen.

5 In dem Patent von Boon *et al.* (US-5544650) ist beschrieben, dass eine Färbung mit einem immunhistochemischen Marker die automatische Detektion von proliferierenden (kanzerogene und nicht-kanzerogene) Zellen in einer Probe erleichtert und in einem semi-automatischen Prozess der kontrollierende Pathologe/Cytologe entscheidet, ob es sich bei den gefärbten Zellen wirklich um kanzerogene Zellen handelt.

10 Das Patent US-6005256 von McGlynn und Akkapeddi beschreibt ausführlich ein Gerät und ein Verfahren zur simultanen Detektion von mehreren fluoreszenzmarkierten Markern in einer Körperprobe, auch zur Identifikation von Krebszellen, ohne aber auf eine konkrete Anwendung in der Krebsdiagnostik einzugehen bzw. entsprechende Markerkombinationen mit erhöhter Spezifität zu benennen.

15 Von Ampersand Medical Systems Group (www.ampersandmedical.com) ist bekannt, dass sie ein neues Screening System für Cervix-Abstriche (InPath) entwickeln, welches neben einer eigenen Probenaufbereitung auch die Fluoreszenzdetektion von nicht genannten biologischen Markern beinhaltet.

20

Aufgabe

25 Der vorliegenden Erfindung beinhaltet Verfahren mit denen Karzinomzellen oder deren Vorstufen in präparierten Gebärmutterhalsabstrichen frühzeitig und zuverlässiger als bisher diagnostiziert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Summarische Beschreibung / Lösung

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen der Anmelder, dass durch gleichzeitigen Nachweis von mindestens zwei molekularen Markern, nämlich krankheits-assoziierten Veränderungen von Genexpressionen bzw. viralen Nukleinsäuren, die Spezifität des Nachweises von krankhaft veränderten Zellen in Gebärmutterhalsabstrichen, z.B. Karzinomzellen und deren Vorstufen, erhöht wird und auf Grund der Aussagekraft kombinierter Markerfärbungen eine spezifischere und darüber hinaus auch eine automatisierbare Detektion ermöglicht.

10

Detaillierte Beschreibung:

Die Erfindung bezieht sich auf molekulare Marker, die bei Einzelnachweisen eine nicht ausreichende Spezifität hinsichtlich der Erkennung von krankhaft veränderten Zellen oder Geweben erreichen, da sie zum Teil auch in nicht krankhaft verändertem biologischen Material in ähnlicher oder unterschiedlicher Menge vorhanden sind. Dies basiert auf der Tatsache, dass diese Marker Proteine sein können, die an physiologischen Regulationsprozessen auch in gesunden Zellen beteiligt sind. Darüber hinaus kann der Nachweis des molekularen Markers aufgrund unspezifischer Kreuzreaktion des Antikörpers nicht eindeutig sein und äußert sich in der Anfärbung von Partikeln des biologischen Materials, die den molekularen Marker nicht beinhalten. Die Erfinder haben die Beobachtung gemacht, dass durch den gleichzeitigen Nachweis von mindestens zwei Markern in einer Zelle, die mangelnde Spezifität des Einzelnachweises kompensiert werden kann, so dass eine höhere Spezifität beim Nachweis von abnormalen Zellen bzw. Gewebeabschnitten gewährleistet ist. Somit ist durch die Kombination mehrerer Marker in einer Zelle bei der Diagnostik von biologischen Proben die Aussagekraft größer als bei der Verwendung von Einzelnachweismarkern.

30

Die Markerkombinationen beinhalten die Visualisierung von Genexpressionen mindestens einer der nachfolgend aufgeführten Genklassen: Onkogene, Tumor-

suppressorgene, Apoptosegene, Proliferationsgene, Reparaturgene und Virusgene, bzw. die einer veränderten Genexpression aus mindestens einer der aufgeführten Genklassen in Kombination mit der Visualisierung viraler Nukleinsäuren. Bevorzugte Kombinationen enthalten folgende molekulare Marker: Her2/neu, p16, p53, MN, mdm-2, bcl-2 und EGF-Rezeptor und DNA der HPV Subtypen 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, 52 . Besonders bevorzugt sind folgende Kombinationen: her2/neu mit p16 oder EGF-R mit p16 oder p53 mit her2/neu oder her2/neu mit mdm-2 oder bcl-2 mit p16 oder bcl-2 mit her2/neu oder p16 mit p53.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse der Anmelder für ein Verfahren zur frühen Diagnose krankheitsassoziierten Zellen bzw. Gewebeabschnitte genutzt, das die Detektion von Kombinationen der beschriebenen molekularen Marker mit dem Ziel einer automatisierten Detektion von Karzinomen und ihrer Vorstufen umfasst. Die automatisierte und spezifische Detektion von Tumorzellen kann durch folgendes Verfahren gewährleistet werden: Zum einen müssen mindestens zwei Signale in einer Zelle vorhanden sein, zum anderen muss das Signal der beiden Marker jeweils über einer individuell definierten Intensität bzw. einem individuell definierten Schwellwert liegen. Durch die Anwendung dieser beiden Kriterien kann man jene Zellen als gesund betrachten, welche z.B. einen Marker über der gesetzten Schwelle exprimieren oder eine Färbung beider Marker unterhalb der jeweilig definierten Signalstärke aufweisen.

Der Ausdruck "Molekularer Marker" umfasst molekulare Veränderungen von Zellen, insbesondere Veränderungen der Genexpression, die im Zusammenhang mit einer veränderten oder krankhaften Zellbeschaffenheit beobachtet worden sind. Verfahren zum Nachweis molekularer Marker umfassen jegliche Verfahren, die die Quantität oder Präsenz der Marker bestimmen, entweder auf Nukleinsäure- oder Proteinebene. Für den Nachweis auf Proteinebene bietet sich die Verwendung von Antikörpern oder anderen spezifischen Bindungsproteinen (z.B. Anti-Cullinen) an, die einen anschließenden cytochemischen oder histochemischen Nachweis mit chromogener und/oder fluoreszenter Detektion erlauben. Für den Nachweis auf Nukleinsäureebene

bieten sich Hybridisierungstechnologien an, die u.U. auch nach zusätzlichen Verstärkungsschritten (z.B. immuncytochemischer Amplifikation von markierten Sonden nach Bindung an die Zielsequenzen) ebenfalls mit cytochemischen oder histochemischen Färbereaktionen nachgewiesen werden können.

5

Der Ausdruck "gleichzeitiger Nachweis von mindestens zwei molekularen Markern" umfasst Verfahren, die die Expression von mindestens zwei Genen in einer Körperprobe, insbesondere auch in einer einzelnen Präparation der Körperprobe, bevorzugt in einer einzelnen Zelle, erkennbar machen, so dass die Genexpressionen in Zusammenhang miteinander betrachtet werden können.

10

Der Ausdruck "Aussagekraft kombinierter Markerfärbungen" umfasst die Verknüpfung von mindestens zwei Informationsinhalten, die auf Grund des Nachweises von mindestens zwei Markern in einer Körperprobe, bevorzugt in einer einzelnen Zelle, gewonnen wurden. Zusätzlich können durch Definition von Schwellwerten der Markerintensitäten gesunde Zellen spezifisch von krankhaften Zellen unterschieden werden.

15

Der Ausdruck "krankhaft veränderte Zellen von Gebärmutterhalsabstrichen" umfasst Karzinome und ihre Vorstufen aus dem Utero-Vaginal-Trakt der Frau, welche durch eine gynäkologische Routineentnahme auf einen Objektträger aufgebracht werden oder im Durchfluss-Fluoreszenzmeßgerät (FACS) vermessen werden.

20

Der Ausdruck "automatisierbare Detektion" umfasst Verfahren, die die manuelle Arbeitskraft von menschlichem Personal ganz oder auch nur in Teilschritten ersetzt und insbesondere bei Schritten des Nachweisverfahrens oder bei der anschließenden Dokumentation oder Informationsverarbeitung Verwendung finden. Dies beinhaltet Schritte der Probenaufbereitung, Probenfärbung, Probenauslesung und Informationsverarbeitung. Die Detektion kann dabei sowohl über Absorptions-, Reflexions- oder Fluoreszenzmessungen erfolgen.

25

30

Der Ausdruck „diagnostisches Expertensystem“ umfasst eine Computersoftware, die die Bildinformationen in einen Diagnosevorschlag umwandelt. Dieses Expertensystem kann die gesamte vorhandene Information oder Teile davon aufgrund von in der Software vorhandenen Parametern oder von externen Informationen, auf die die Software zugreifen kann, zu einem Diagnosevorschlag konsolidieren. Sollten zur Absicherung des Diagnosevorschlags weitere Parameter erforderlich sein, kann die Software die Erhebung dieser Parameter vorschlagen oder durch Kopplung mit geeigneten Analysegeräten im Sinne eines Reflex-Algorithmus selbsttätig anfordern.

Der Ausdruck "Verstärkungssystem" umfasst biochemische Verfahren, die die Signalintensitäten erhöhen, so dass ein für den spezifischen Nachweis eines molekularen Markers günstigeres Signal/Rausch-Verhältnis erzeugt wird. Dies wird üblicherweise durch Einsatz von zusätzlichen Antikörpern und/oder enzymatischer Nachweisreaktionen erreicht.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, krankhaft veränderte Zellen, z.B. Karzinome und ihre Vorstufen des Gebärmutterhalses spezifisch zu detektieren. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, das folgende Bestandteile enthält:

- (a) Reagenzien zum Nachweis von mindestens zwei der molekularen Marker, nämlich markierte und/oder unmarkierte Antikörper gegen Her2/neu, p16, p53, MN, mdm-2, bcl-2, EGF-Rezeptor und HPV L1, sowie markierte DNA-Sonden die Bereiche des viralen HPV-Genoms enthalten.
- (b) Übliche Hilfsmittel, wie Puffer, Träger, Signalamplifikationssubstanzen, Färbereagenzien, etc.
- (c) Automatisierte Verfahren der Probenaufbereitung, -färbung und Signaldetektion

(d) Protokolle und Reagenzien zur Anfärbung von Zelllinien als Kontrollreaktion

Für die einzelnen Komponenten des Kits gelten die vorstehenden Ausführungen.
Einzelne oder mehrere Komponenten des Kits können auch in veränderter Form
5 Verwendung finden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich Karzinome und ihre Vorstufen in
Gebärmutterhalsabstrichen manuell, aber auch in teil- oder vollautomatisierten Ver-
fahren zu detektieren. Da die erfindungsgemäß erzielten Ergebnisse des gleichzei-
10 tigen Nachweises von mindestens zwei molekularen Markern nicht einer subjektiven
Bewertung unterliegen, sondern vielmehr einer objektiven, automatisierten Detektion
von krankhaften Veränderungen in biologischen Materialien förderlich sind, können
die morphologischen Befunde, beispielsweise die eines Pap-Tests, durch objektive
Parameter, z.B. auch in Form von "Reflex-Testing", ergänzt werden. Aufgrund der
15 schnellen und automatisierten Handhabbarkeit der Verfahren sind sie für große,
kosten- und personalsparende Screening-Verfahren geeignet.

Somit stellt die vorliegende Erfindung einen wichtigen Beitrag zur spezifischen
Detektion von Tumorzellen und deren Vorläufern bei der Früherkennung des Gebä-
20 mütterhalskrebses in der Diagnostik von Abstrichen dar.

Beispiele

Nachfolgend werden beispielhaft Protokolle zur Durchführung der beschriebenen Erfindung gegeben. In diesen Beispielen werden exakte Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Antikörper bzw. DNA-Sonden angegeben, allerdings können verschiedene Parameter, wie z.B. Inkubations- und Waschtemperatur, Inkubations- und Waschzeiten sowie die Konzentration von Antikörpern und anderen Reagenzien, in Abhängigkeit von den jeweiligen Antikörpern bzw. DNA Sonden variiert werden. Ebenso können hier beschriebene Verstärkungssysteme weggelassen werden oder neu hinzugefügt werden.

Versuchsbeschreibung zum simultanen Nachweis von zwei molekularen Markern mit spezifischen Antikörpern auf Cervix-Abstrichen

Durch Präparationstechniken wie Thin-Prep (Firma Cytyc) werden die Zellen, die in Preservcyt (Firma Cytyc) gelagert werden, auf Objektträger (OT) aufgebracht. Mit kaltem Ethanol werden die Zellen 3 Minuten fixiert, danach wäscht man die Objektträger in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2 mM, KH₂PO₄). Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % fötalem Kälberserum in PBS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur (RT) werden die OT für 60 min in einer feuchten Kammer gleichzeitig mit zwei spezifischen, monoklonalen Antikörpern (her2/neu (Klon 3B5, 20 µg/ml) und p16 (Klon DCS 50.1, 10 µg/ml) von Oncogene Science/BAYER) bei RT inkubiert. Einer der Antikörper ist mit Fluorescein, der andere mit Biotin gekoppelt. Nach jedem der folgenden Inkubationsschritte werden die OT jeweils 3 mal 5 min mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der einzelnen Antigen-Antikörper-Bindungen werden nacheinander zwei unterschiedliche Färbesysteme angewendet. Als erstes Färbesystem inkubiert man 30 min mit Streptavidin-Cy3 (Mobi Tec, 5 µg/ml in PBS mit 5 % Kälberserum), danach mit anti-Streptavidin-Biotin (Vector; 2 µg/ml in PBS mit 5 % Kälberserum) für weitere 30 min, um eine Verstärkung des Signals zu erreichen. Zuletzt inkubiert man noch mal mit Streptavidin-Cy3. Das zweite Färbesystem besteht aus dem Alexa Fluor 488

Signal-Amplification Kit™ (Molecular Probes, Bestell-Nr. A-11053). Zuletzt werden die OT mit Mowiol™ (Hoechst) eingedeckelt.

Versuchsbeschreibung zum simultanen Nachweis von drei molekularen Markern mit
5 spezifischen Antikörpern auf Cervix-Abstrichen

Durch Präparationstechniken wie Thin-Prep (Firma Cytoc) oder Cyto-Spin (Firma Shandon) werden die Zellen, die z.B. in Preservcyt (Firma Cytoc) gelagert werden, auf Objektträger (OT) aufgebracht. Mit kaltem Ethanol werden die Zellen 3 Minuten
10 fixiert, danach wäscht man die Objektträger in PBS (137 mM NaCl, 3mM KCl, 4mM Na₂HPO₄, 2 mM, KH₂PO₄, pH 7,4). Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % fötalem Kälberserum mit 4 mmol/l Levamisole (Firma Sigma) in PBS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur (RT) werden die OT für 60 min in einer feuchten Kammer gleichzeitig mit drei spezifischen, monoklonalen Antikörpern
15 (her2/neu (Klon 3B5, 20 µg/ml), bcl-2 (Klon 100, 2 µg/ml) und p16 (Klon DCS 50.1, 10 µg/ml) von Oncogene Science/BAYER) bei Raumtemperatur inkubiert. Der erste Antikörper ist mit Fluorescein, der zweite mit Digoxigenin und der dritte mit Biotin gekoppelt. Nach jedem der folgenden Inkubationsschritte werden die OT jeweils 3 mal 5 min mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der einzelnen Antigen-Antikörper-
20 Bindungen werden nacheinander drei unterschiedliche Färbesysteme angewendet. Als erstes Färbesystem inkubiert man 30 min mit Streptavidin-Cy3 (Mobi Tec, 5 µg/ml in PBS mit 5 % Kälberserum mit 4 mmol/l Levamisole), danach mit biotinyliertem anti-Streptavidin Antikörper (Vector; 2 µg/ml in PBS mit 5 % Kälberserum mit 4 mmol/l Levamisole) für weitere 30 min, um eine Verstärkung des
25 Signals zu erreichen. Zuletzt inkubiert man noch mal mit Streptavidin-Cy3. Das zweite Färbesystem besteht aus dem Alexa Fluor 488 Signal-Amplification Kit™ (Molecular Probes, Bestell-Nr. A-11053). Für das dritte Färbesystem inkubiert man mit einem Konjugat aus anti-Digoxigenin Antikörper vom Schaf und Alkalischer Phosphatase (DAKO, 1:150 verdünnt in PBS mit 5 % Kälberserum mit 4 mmol/l
30 Levamisole) für 30 min. Die fluoreszente Auslesung wird mit dem ELF97 Cytological Labeling Kit (Bestell-Nr. E 6602) von Molecular Probes nach Angaben

des Herstellers durchgeführt. Zuletzt werden die OT mit MowiolTM (Hoechst) eingedeckelt.

5 Versuchsbeschreibung zum simultanen Nachweis von zwei molekularen Markern auf
Cervix-Abstrichen mit einem spezifischen Antikörper und einer HPV DNA Sonde

Bei der Kombination von einer immunocytochemischen Antikörperfärbung mit einer
DNA *in situ* Hybridisierung wird die Probenpräparation, -fixierung und Blockierung
sowie die Inkubation mit einem Primärantikörper wie im oben beschriebenen
10 Protokoll für Antikörperfärbung durchgeführt. Der primäre Antikörper ist ein
Fluorescein gekoppelter Antikörper gegen das Protein p16 (Klon DCS 50.1) von
Oncogene Science/BAYER und wird in einer Konzentration von 10 µg/ml
eingesetzt. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung wird zunächst mit einem
Sekundärantikörper, Kaninchen anti-FITC (MoBiTec) in einer Konzentration von
15 15µg/ml, und anschließend mit einem Ziege anti-Kaninchen Antikörper gekoppelt an
Alkalische Phosphatase von Dianova in einer Verdünnung 1:100 in PBS, für 30 min.
bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Als Färbesystem wird 5 min bei Raumtem-
peratur mit dem chromogenen alkalische Phosphatase Substrat Fuchsin von DAKO
nach Angaben des Herstellers inkubiert. Zur Fixierung der Färbung wird 5 min. mit
20 4 % Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Daran schließt sich die *in situ* Färbung an.
Dazu werden die OT zunächst 2 mal in 2xSSC Puffer (0,3M NaCl, 30mM Na-citrat)
gewaschen und anschließend für 60 min bei 37°C mit 40µg/ml RNase in 2xSSC ver-
daut. Nach 2 zweiminütigen Waschschritten mit PBS wird für 10 min mit 2µg/ml
Proteinase K bei 37°C verdaut. Nach 3 x 2 min Waschen mit destilliertem Wasser,
25 werden 20µl gebrauchsfertige Digoxigenin markierte HPV16 DNA-Sonde (Kreatech)
in Hybridisierungspuffer (Kreatech) auf die OT gegeben, mit Deckgläschen
abgedeckt, abgedichtet, für 8 min auf 94°C zur Denaturierung erhitzt und
anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Abnahme der Hybridisierungs-
lösung wird erneut mit 3 % Kaninchen Serum in Boehringer Blocking Puffer (0,05g
30 Blocker (Boehringer 1201107) in 5ml Blockpuffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris-
HCl, pH 7,5)) für 30 min blockiert. Für die chromogene Auslesung werden nachein-

5 ander mit DAKO Kaninchen anti-Digoxigenin Antikörper gekoppelt mit Peroxidase (1:150 verdünnt mit Blockpuffer), Dig-Tyramid (5,71µg/ml) (hergestellt wie beschrieben in: Hopman et al., 1998, J Histochem Cytochem., 46(6), 771-777) in PBS/0,1M Imidazol pH 7,6/0,001 % H₂O₂ und wiederum mit Kaninchen anti-Digoxigenin Antikörper gekoppelt mit Peroxidase (DAKO, 1:150 verdünnt in TBST (50mM Tris/HCl, 0,3M NaCl, 1 % Tween 20, pH 7,6) mit 3 % Kaninchenserum) für jeweils 15 min bei RT inkubiert. Dazwischen wird jeweils 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Für die chromogene Farbreaktion wird mit DAB Substrat von DAKO nach Angaben des Herstellers für 10 min gefärbt. Zuletzt werden die OT mit MowiolTM eingedeckelt.

Versuchsbeschreibung zur automatisierten Detektion abnormaler Zellen, die durch simultanen Nachweis von mindestens zwei molekularen Markern angefärbt wurden

15 Cervix-Abstriche, bei denen mindestens zwei molekulare Marker nach den oben beschriebenen Methoden mit Antikörpern nachgewiesen wurden, werden mittels eines Fluoreszenzmikroskops mit einem ansteuerbaren Kreutzisch für bis zu 8 Objektträger (Olympus AX70 mit Multicontrol-Box 2000-3 und analySIS Treibersoftware „Modul Stage^m“), einer modifizierten Version der analySIS 3.0 Software der Firma Soft Imaging Systems GmbH (SIS), die als SIS-Paket „Grabbit Dual Pro“ zusätzliche Module, insbesondere ein FFT- (=„Fast Fourier Transformation“), ein MIA- (=„Multiple Image Alignment“) und ein C-Modul enthält, ausgewertet. Für die Bildaufnahmen werden hochauflösende Schwarz-Weiß- (MV2 Slow Scan Kamera, 12 Bit von SIS) und Farbkameras (DXC-950P 3CCD Chip von Sony) verwendet. In Kombination sind diese Systeme für eine 16 Bit Grautonbildanalyse und zur Farbbildanalyse im RGB- und HSI-Farbraum bis 24 Bit Bildtiefe geeignet.

30 Die Position von insgesamt bis zu acht Objektträgern wird nach Kalibrierung des ansteuerbaren Kreutzisches (analySIS „Modul Stage“) durch Definition von acht aufeinanderfolgenden Tischwegen im Menü „Automation“ (analySIS „Modul

Grains") relativ zum „logischen Nullpunkt" erfasst. Die Gesamtfläche der biologischen Proben, die sich auf Grund der automatisierten Thin-Prep (Cytoc) Methodik immer in einem definierten Bereich der Objektträger befinden, wird flächendeckend in Einzelbereiche einer Größe von $571,2\mu\text{m} \times 457,96\mu\text{m}$ zerlegt, die dem Bildausschnitt eines Photos bei 20facher Vergrößerung mit der mikroskopischen Einheit entsprechen. Jede biologische Probe wird durch einen Tischweg analysiert. Jeder Tischweg besteht aus 750 einzelnen Tischwegpositionen (30 Zeilen, 25 Spalten), die das Mikroskop meanderförmig horizontal als Serie von Tischwegpositionen abfährt, so dass jeder Bereich der biologischen Probe der jeweiligen Objektträgerposition durch eine Tischwegposition „Stoß an Stoß" und nicht überlappend erfasst ist. Für jedes Präparat auf dem Arbeitstisch ist somit jeweils ein identischer Tischweg definiert. Die Addition der 8 Tischwege im Menü „Automation" ermöglicht die automatisierte Analyse aller auf dem Arbeitstisch positionierten Präparate.

Generell wird jede Tischwegposition nach Anregung mit den 3 verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen jeweils 1 x mit der hochauflösenden S/W-Kamera und entsprechenden Fluoreszenzfarbfiltern fotografiert. Die Fluoreszenzintensitäten der Einzelphotos werden daraufhin vermessen. Dies geschieht mittels der Registrierkarte „Messung" im Menü "Automation". Durch Übereinanderlagerung von blauen, roten und grünen Einzelbildern werden Farbmischungen erzeugt, die mit den Fluoreszenzintensitäten der Einzelbilder an identischen Tischwegpositionen korrelieren. Es erfolgt die "Phasenanalyse", das heißt die Bereiche bestimmter Farbmischungen werden vermessen und als Fläche quantitativ wiedergegeben. Bestimmte Farbmischungen sind dabei für krankhaft veränderte Zellen charakteristisch, so dass eine diagnostische Aussage getroffen werden kann.

Im Einzelnen wird für die Fluoreszenzmessungen mit mehreren molekularen Markern pro Tischwegposition für jeden Fluoreszenzfilterkanal ein Schwarz-Weiss-Photo gemacht. Den Einzelbildern einer Tischwegposition werden daraufhin Farben zugeordnet und die so entstehenden Falschfarbenbilder werden mittels des "FIP-

Moduls" übereinandergelegt, so dass sich durch "Addition" der unterschiedlichen Fluoreszenzfarben Farbmischungen in Abhängigkeit zu den Fluoreszenzintensitäten ergeben. Beispielsweise kommt es bei gleichzeitiger und gleichstarker Fluoreszenzfärbung im roten und grünen Farbkanal zur Bildung einer gelben Mischfarbe an der entsprechenden Bildposition. Je nach Stärke der Fluoreszenzintensitäten können die Mischfarben auch ins Rot bzw. Grün tendieren. In ähnlicher Weise kommt es bei der Überlagerung von blauen, grünen und roten Fluoreszenzen gleicher Intensität zur Bildung einer weißen Mischfarbe. Diese überlagerten Bilder werden daraufhin mittels Schwellwertsetzung und anschließender "Phasenanalyse" vermessen, wobei dies direkt durch Farbschwellwertsetzung im RGB-Modus (Menü Bilder) erfolgt. Diese Schritte lassen sich manuell ausführen, können aber auch automatisiert durchgeführt werden, indem Makros im Menü „Extras“ unter „Makros aufzeichnen“ erstellt und anschließend im Menü "Automation" abgerufen werden. Letztendlich erhält man für bestimmte Farbmischungen eine quantitative Aussage in Form einer Flächenangabe (= Fläche auf der biologischen Probe, die auf Grund der Anfärbung mit mindestens 2 molekularen Markern mit bestimmter Intensität eine genau definierte Mischfarbe aufweist). Mit der Registrierkarte "Protokoll" im Menü „Automation“ können sowohl die analysierten Bilder als auch die Flächenangaben für die jeweiligen Tischwegpositionen automatisch abgespeichert werden. So erhält man für jede Tischwegposition eine quantitative Aussage über die in diesem Bereich gemessenen Fluoreszenzintensitäten bzw. Farbmischungen. Die Werte der Farbmischungen der einzelnen Tischwegpositionen (= Übereinanderlagerung von drei Einzelphotos) werden für jeden Tischweg (= Einzelpräparat) in jeweils einer Excel-Datei wiedergegeben. Die Exceltabellen bestehen demzufolge aus 750 Zeilen für die 750 einzelnen Tischwegpositionen pro Tischweg und aus 8 Spalten für die 8 unterschiedlichen Farbmischungen. Da bestimmte Farbmischungen (z.B. gelbe Farbmischungen bei der Darstellung von zwei Einzelmarkern in Rot und Grün) auf die gleichzeitig hohe Expression mehrerer krankheitsassoziiierter Marker zurückzuführen sind, werden diese Tischwegpositionen als "krankhaft" markiert (= „Flagging“), so dass die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen später als Einzelbilder zur Kontrolle visuell begutachtet werden können. Die in einer Exceltabelle für die acht Farb-

mischungen angegebenen Flächen werden mittels eines Makros in Excel verrechnet, d.h. sämtliche Werte einer Spalte (= eine bestimmte Farbmischung) werden aufsummiert. Somit erhält man für ein biologisches Präparat (= Tischweg) einen Zahlenwert für jede der acht Mischfarben. Überschreitet die Summe von bestimmten Farbmischungen, die für krankhaft veränderte Zellen charakteristisch sind (wie z.B. die oben bereits erwähnte gelbe Farbmischung), einen kritischen Mindestwert, wird die durch den entsprechenden Tischweg analysierte biologische Probe bzw. der jeweilige Cervix-Abstrich als krankhaft eingestuft. Somit gelangt man über die quantitative Analyse der verrechneten Einzelfluoreszenzintensitäten automatisch zu einer diagnostischen Aussage für die biologische Probe.

Versuchsbeschreibung zum simultanen Nachweis von zwei molekularen Markern mit spezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer

Abstrichzellen, die in Preservcyt (Cytoc) gelagert sind, werden zunächst durch ein Nylontuch mit 100 µm großen Poren gepresst, um Zellklumpen zu vereinzeln. Nach Sedimentierung durch Zentrifugation wird 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit einer der nachfolgenden Methoden permeabilisiert: a) OPF Methode (ORTHOPermeaFix™ b) F&P (FIX&PERM Cell Permeabilization Kit, Imtec) c) MWH (microwave heating). Alle Methoden sind entsprechend der Herstellerangaben bzw. nach Millard *et al* (Clin Chem 1998, 44, 2320-2330) durchzuführen. Die Inkubation der permeabilisierten Zellen mit den beiden Maus-Antikörpern (her2/neu (Klon 3B5, 20 µg/ml), und p16 (Klon DCS 50.1, 10 µg/ml) von Oncogene Science/BAYER) erfolgt für 60 min. Der erste Antikörper ist mit Fluorescein, der andere mit Biotin gekoppelt. Nach jedem der folgenden Inkubationsschritte werden die Zellen sedimentiert und insgesamt 2 mal mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der einzelnen Antigen-Antikörper-Bindungen werden nacheinander zwei unterschiedliche Färbesysteme angewendet. Für das erste Färbesystem inkubiert man 30 min mit Streptavidin-Cy3 (Mobi Tec, 5 µg/ml). Das zweite Färbesystem besteht aus dem Alexa Fluor 488 Signal-Amplification Kit™ (Molecular Probes, Bestell-Nr.

A-11053). Anschließend werden die Zellen in ISOTON II (Coulter) aufgenommen und in einem Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) vermessen, welches mit Laser-Anregung für die grüne und rote Fluoreszenz ausgestattet ist. Die Fluoreszenzintensitäten können graphisch dargestellt werden. Die relative und absolute Anzahl der negativen, der einfach positiven bzw. der doppelt positiven Zellen kann nach Definition von Schwellwerten der Signalintensitäten dargestellt werden. Ein diagnostisches Expertensystem wandelt diese Information in einen Diagnosevorschlag um.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Tumorzellen und deren Vorläufern in Gebärmutterhalsabstrichen durch simultane Detektion von mindestens zwei molekularen Markern in einer Zelle.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Marker aus mindestens einer der nachfolgend aufgeführten Gruppen ausgewählt ist: Tumorsuppressorgene, Apoptosegene, Proliferationsgene, Reparaturgene und Virusgene.
10
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer der nachfolgenden Marker in der Kombination enthalten ist: Her2/neu, p16, p53, MN, mdm-2, bcl-2, EGF-Rezeptor, spezifische DNA der HPV Subtypen 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, 52.
15
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Markerkombinationen her2/neu mit p16 oder EGF-R mit p16 oder p53 mit her2/neu oder her2/neu mit mdm-2 oder bcl-2 mit p16 oder bcl-2 mit her2/neu oder p16 mit p53 enthalten.
20
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass 3 Marker nachgewiesen werden.
- 25 6. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Kit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien Antikörper oder Nukleinsäuren sind.

8. Kit nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet dass die Antikörper oder Nukleinsäuresonden direkt oder indirekt durch fluoreszierende oder chromogene Farbstoffe ausgelesen werden.
- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 , dadurch gekennzeichnet, dass es eine automatisierbare Detektion abnormaler Zellen ermöglicht, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Marker detektiert werden und die Signalintensitäten kombiniert und verrechnet werden.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die automatische Informationsverarbeitung mit einem diagnostischen Expertensystem verbunden ist, das die Bildinformation zu einem Diagnosevorschlag konsolidiert und gegebenenfalls ein Reflex-Testing ermöglicht.
- 15 11. Gesamter Prozess nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Prozess aus vollautomatischer Probenaufbereitung, Probenfärbung, Probenauslesung und Informationsverarbeitung oder Unterprozessen, die mindestens 2 der jeweiligen Unterprozesse beinhalten, besteht.

Verfahren zur spezifischen Detektion von Tumorzellen und ihren Vorstufen in Gebärmutterhalsabstrichen durch simultane Messung von mindestens zwei verschiedenen molekularen Markern

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft ein automatisierbares Verfahren zur verbesserten Diagnose von Krebs und seinen Vorstufen in Gebärmutterhalsabstrichen durch die simultane Anfärbung und Detektion von mindestens zwei verschiedenen molekularen Markern, die krankheits-assoziiert eine veränderte Genexpression aufweisen, in einer Zelle durch die Verwendung von Antikörpern oder auch Nukleinsäure-Sonden.